

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**



Generate Collection

L14: Entry 374 of 590

File: DWPI

May 27, 1995

DERWENT-ACC-NO: 1996-038608

DERWENT-WEEK: 199604

COPYRIGHT 2003 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Prepn. of pyo-bacteriophage - comprises separate cultivation of the bacteria and their phage(s), combining the resulting phago-lysates, stirring, ultrafiltration and final sterilising micro-filtration

INVENTOR: GORBATKOVA, G A; KAZAKOVA, T B ; VOROSHILOVA, N N

PRIORITY-DATA: 1992SU-5030309 (March 2, 1992)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
RU 2036232 C1	May 27, 1995		005	C12N003/00

INT-CL (IPC): C12 N 3/00

ABSTRACTED-PUB-NO: RU 2036232C

BASIC-ABSTRACT:

Pyobacteriophage is obtd. more efficiently by growing the bacteria and corresp. bacteriophages of Streptococcus, Bacillus pyocyaneus, E. coli, Proteus and additional Klebsiella separately in liq. media, and combining the resulting phagolysates. Subsequent microfiltration through a membrane with 0.2 mu pores is followed by ultrafiltration to remove bacterial metabolites and proteins, and final sterilising microfiltration.

USE - The method is used in prodn. of medicinal preps.

ADVANTAGE - Purer prepn., with time of process reduced from 30-34 to 4-6 hrs., is obtd.

ABSTRACTED-PUB-NO: RU 2036232C

EQUIVALENT-ABSTRACTS:

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0



РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) RU⁽¹¹⁾ 2 036 232⁽¹³⁾ C1
(51) МПК⁶ C 12 N 3/00

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 5030309/13, 02.03.1992

(46) Дата публикации: 27.05.1995

(56) Ссылки: 1. Прозоровский С.П. и Генчиков А.А. Принципы борьбы с внутрибольничными инфекциями. 2. Регламент производства пнобактериофага комбинированного жидкого N 242 - 8. Тбилисский НИИВС.

(71) Заявитель:
Уфимский научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова

(72) Изобретатель: Ворошилова Н.Н.,
Каззкова Т.Б., Горбаткова Г.А., Боговазова
Г.Г., Афанасьева Э.В., Бондаренко В.М.

(73) Патентообладатель:
Уфимский научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПНОБАКТЕРИОФАГА

(57) Реферат:

Использование: биотехнология, производство медицинских биологических препаратов. Сущность способа: проводят культивирование бактерий и бактериофагов стафилококка, стрептококка, синегнойной палочки, кишечной палочки, протей и клебсиелл в жидкой питательной среде. Каждый вид бактерий и бактериофагов культивируют отдельно, но условия культивирования являются общими для всех видов. Культивирование проводится в условиях интенсивной аэрации и перемешивания при 30 - 70%-ном насыщении растворенным кислородом культуральной среды с использованием экспоненциально

размножающейся бактериальной популяции. Полученные фаголизаты всех бактериофагов сводят в единый объем, перемешивают и подвергают микро- и ультрафильтрации в режиме тангенциального потока через мембраны с размером пор 0,2 мкм и мембраны с порогом задержания вещества 150 - 200 КД, после чего проводят заключительную стерилизующую микрофильтрацию. Степень очистки бактериофагов от метаболитов бактерий и белков среды составляет 98 ± 1,1%. Способ позволяет расширить спектр антибактериальной активности препарата и обеспечивает высокий выход биомассы бактериофагов, 2 табл.

RU 2 036 232 C1

RU 2 036 232 C1



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 036 232** (13) **C1**
(51) Int. Cl. ⁶ **C 12 N 3/00**

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 5030309/13, 02.03.1992

(46) Date of publication: 27.05.1995

(71) Applicant:
Ufimskij nauchno-issledovatel'skij institut
vaksin i syvorotok im.I.I.Mechnikova

(72) Inventor: Voroshilova N.N.,
Kazakova T.B., Gorbatkova G.A., Bogovazova
G.G., Afanas'eva Eh.V., Bondarenko V.M.

(73) Proprietor:
Ufimskij nauchno-issledovatel'skij institut
vaksin i syvorotok im.I.I.Mechnikova

(54) METHOD OF PYOBACTERIOPHAGE PREPARING

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology. SUBSTANCE: method involves cultivation of bacteria and bacteriophages of staphylococcus, streptococcus, pyocyanic bacillus, Escherichia coli, Proteus and Klebsiella on the liquid nutrient medium. Every species of bacterium and bacteriophage is cultured separately but under similar conditions of cultivation for all species. Cultivation is carried out under conditions of intensive aeration and stirring of medium using exponentially multiplying bacterial population. Prepared phage lysates of all

bacteriophages were combined to the total volume, stirred and subjected for micro- and ultrafiltration at the regime of tangential flow through membrane (pore size is 0.2 microm) and membranes showing retaining threshold of substances with molecular mass 150-200 kDa, and then final sterilizing microfiltration is carried out. Purification degree of bacteriophages from bacterium metabolites and medium proteins is 98±1.1%. EFFECT: broadened spectrum of antibacterial activity of preparation, increased yield of bacteriophage biomass. 2 tbl

RU 2 036 232 C1

RU 2 036 232 C1

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к производству медицинских биологических препаратов.

Гнойно-воспалительные заболевания, вызванные бактериями стафилококка, стрептококка, синегнойной и кишечной палочкой, протеем, широко распространены и трудно поддаются антибиотикотерапии, часто заканчиваются смертельным исходом, особенно у детей раннего возраста. В последние годы наряду с перечисленными возбудителями в 10-30% случаев от больных выделяются бактерии клебсиелл пневмонии.

Известен препарат лиобактериофага комбинированного, включающий бактериофаги стафилококка, стрептококка, синегнойной палочки, кишечной палочки и протее. Способ получения лиобактериофага предусматривает раздельное статическое культивирование бактериофагов в жидкой питательной среде в бутылках с использованием одномоментного добавления в питательную среду бактериальных клеток до концентрации $3 \cdot 10^7$ в 1 мл, находящихся в стадии отмирания (18-часовая культура) и маточного фага в количестве 0,2% от объема среды, без учета множественности заражения и урожайности бактериофагов с последующей стерилизующей микрофильтрацией в тупиковом режиме через керамические фильтры (свечи Шамберлана).

Недостатками известного способа являются:

низкий выход биомассы бактериофагов при их культивировании, обусловленный фазой развития (фаза отмирания) бактериальной популяции, используемой для размножения фагов, а также неоптимизированными условиями культивирования;

нетехнологичность, связанная с использованием для стерилизующей микрофильтрации тупикового режима, керамических фильтров, обладающих низкой производительностью в связи с фильтрацией в тупиковом режиме;

нетехнологичность способа, обусловленная получением фагов в бутылках и невозможность получения препарата в больших объемах;

реактогенность препарата, связанная с присутствием в составе препарата белков питательной среды и метаболитов бактериальных клеток, образующихся в процессе роста бактериальной популяции, а также при фаголизисе;

недостаточно широкий спектр действия препарата, связанный с отсутствием в составе препарата бактериофагов клебсиелл пневмонии;

длительность технологического цикла более 30 ч.

Целью изобретения является разработка нового способа получения лиобактериофага и расширение спектра действия препарата.

Для этого в состав препарата, содержащего бактериофаги стафилококка, стрептококка, синегнойной палочки, кишечной палочки и протее, дополнительно вводят бактериофаги клебсиелл, получение бактериофагов проводят с использованием экспоненциально размножающейся бактериальной популяции в жидкой питательной среде с последующей очисткой препарата путем микро- и ультрафильтрации

в режиме тангенциального потока. Микрофильтрацию проводят на мембранах с размером пор 0,2 мкм, а ультрафильтрацию на мембранах с порогом задержания веществ 150-200 КД. После очистки проводят стерилизующую микрофильтрацию.

Сравнение существенных признаков предлагаемого технического решения и прототипа показывает, что общим для них является процесс культивирования в жидкой питательной среде для получения биомассы фагов стафилококка, стрептококка, синегнойной, кишечной палочки и протее, а также процесс заключительной стерилизующей микрофильтрации фаголизатов для удаления бактериальных клеток.

Отличительными существенными признаками предлагаемого способа являются: введение в состав препарата бактериофагов клебсиелл пневмонии, позволяющее на $75 \pm 2\%$ расширить спектр литической активности препарата в отношении бактерий клебсиелл пневмонии и расширить показания к его применению (в прототипе компонент бактериофагов клебсиелл пневмонии отсутствует);

использование вместо статического культивирования на бактериальных клетках в стадии отмирания без учета урожайности фагов и множественности заражения (прототип) периодического динамического управляемого культивирования на экспоненциально размножающейся бактериальной популяции, позволяющего повысить на 50-90% выход биомассы фагов;

очистка препарата микрофильтрацией через мембраны с размером пор 0,2 мкм и ультрафильтрацией в режиме тангенциального потока на плоских мембранах УМПП с порогом задержания веществ 150-200 КД для очистки препарата фагов от метаболитов бактерий и белков питательной среды и снижения реактогенности и токсичности препарата при полостном введении. Степень очистки в сравнении с прототипом $98 \pm 1,1\%$

В литературе описан способ получения бактериофагов энтеробактерий (авт. св. N 1058283), предусматривающий периодическое динамическое культивирование на экспоненциально размножающейся бактериальной популяции.

Однако использование экспоненциально размножающейся бактериальной популяции для получения стафилококкового, стрептококкового, синегнойного бактериофагов в литературе не описано

Описанный в литературе способ очистки бактериофагов (авт. св. NN 1412302) включает в себя четыре этапа:

микрофильтрацию, которая проводится в тупиковом режиме в три этапа (на фильтр-картоне, на целлюлозных мембранах с размером пор 0,5-0,7 мкм, затем на целлюлозных мембранах с размером пор 0,2 мкм) и четвертый этап очистки фаголизатов методом ультрафильтрации в режиме тангенциального потока через полые волокна с порогом задержания веществ 100 КД. Предлагаемый способ включает двухэтапную очистку: микрофильтрацию в режиме тангенциального потока на капроновых мембранах с размером пор 0,2 мкм и очистку ультрафильтрацией в режиме

RU 2036232 C1

RU 2036232 C1

тангенциального потока на плоских мембранах с размером пор 150-200 КД. Предлагаемый способ микрофильтрации на капронных мембранах более технологичен, производителен и выдерживает 50-70 циклов в отличие от одноразовых целлюлозных мембран и фильтр-картона. Плоские мембраны для ультрафильтрации имеют размер пор 150-200 КД, они более производительны, чем модули с полыми волокнами, вследствие большей скорости потока на плоскорамных установках, определяемой диаметром просвета волокна (полые волокна) и высотой камеры (плоскорамная установка). Использование полых волокон не позволяет в отличие от плоских мембран удалять из фаголизатов вещества, в том числе и фракции эндотоксина, образующиеся при фаголизисе, с молекулярной массой более 100 КД. Очистка на полых волокнах фаголизатов, полученных на таких средах, как мясоептонный бульон и бульон Мартена, содержащих высокомолекулярные фракции белков и пептидов, практически невозможна вследствие образования слоя белка на внутренней поверхности волокон и замедления фильтрации из-за белок-белковых взаимодействий. На плоскорамных установках фаголизаты, полученные на мясоептонном бульоне и бульоне Мартена, фильтруются также хорошо, как и фаголизаты, не содержащие высокомолекулярных белков и пептидов питательных сред.

Проведенный анализ свидетельствует, что предлагаемая совокупность существенных признаков является новой, а влияние отличительных от прототипа существенных признаков на достижение технического результата не следует из известного уровня техники, т.е. предлагаемый способ соответствует критериям "новизна" и "изобретательский уровень".

Пример 1. Способ получения лиобактериофага.

Способ культивирования бактериофагов, входящих в состав препарата лиобактериофага, является общим для всех. Культивирование бактериофагов проводят на бульоне Мартена, Хоттингера, мясоептонном бульоне или бульоне на основе ферментативного гемогидролизата. Культивирование проводят в ферментерах в условиях интенсивной аэрации и перемешивания при 30-70%-ном насыщении растворенным кислородом с использованием эклоненциально размножающейся бактериальной популяции. Каждый вид бактериофагов культивируют отдельно. Для этого в питательную среду вносят бактериальную культуру до конечной концентрации $5 \cdot 10^7$ бакт. кл/мл и выращивают при 37°C в условиях 30-70%-ного насыщения кислородом в течение 1,0-1,5 ч до концентрации $2 \cdot 5 \cdot 10^8$ бакт. кл/мл, после чего заражают бактериофагом с множественностью заражения 1/30 и культивируют в том же режиме в течение 1-2 ч до полного лизиса бактериальной популяции, после чего все бактериофаги сводят в единый объем, перемешивают и фильтруют в режиме тангенциального потока через фильтры с размером пор 0,2 мкм. Время фильтрации 100 л препарата составляет 10 мин.

Отфильтрованный фаголизат очищают путем фильтрации через плоскорамный аппарат УФР-4М в режиме тангенциального потока через мембраны с порогом задержания веществ 150-200 КД. Степень очистки бактериофагов от метаболитов бактериальных клеток составляет $98 \pm 1,1$. Затем очищенный препарат лиобактериофага фильтруют через стерильные фильтры типа "Владипор" с размером пор 0,2 мкм, после чего стерильно разливают в ампулы и флаконы и используют для лечения.

Как видно из табл. 1, использование предлагаемого способа позволяет: повысить на 50-90% выход биомассы фагов при культивировании и сократить время культивирования в среднем на 21 ч ($P < 0,05$, $P < 0,001$);

очистить препарат от метаболитов бактерий и белков среды на $98 \pm 1,1\%$

повысить производительность и сократить время стерилизующей микрофильтрации в среднем на 8 ч;

сократить время технологического цикла в среднем на 25 ч ($P < 0,001$)

Пример 2. Биологические свойства препарата бактериофага.

Препарат очищенного бактериофага, полученный предлагаемым способом, обладает активностью в отношении бактерий клебсиелл пневмонии $75 \pm 2\%$ (табл. 2). Как видно из табл. 2, лиобактериофаг, полученный предлагаемым способом, в сравнении с прототипом был очищен от метаболитов бактериальных клеток и белков питательной среды. Степень очистки по белку составляет $98 \pm 1,1\%$

Препарат очищенного лиобактериофага в отличие от прототипа не обладал токсическими свойствами при внутрибрюшинном введении препарата белым мышам в дозе, в 3500 раз превышающей максимальную разовую для человека в пересчете на ед. массы тела Гибели животных, падения массы тела и патологических изменений внутренних органов не обнаружено.

Кроме того, препарат очищенного лиобактериофага в отличие от прототипа не обладал токсическими свойствами при внутрибрюшинном введении в течение 21 дня в терапевтических дозах в расчете на ед. массы тела (хроническая токсичность). Препарат обладал антибактериальной активностью в отношении бактерий стафилококка в титре $10^5 \cdot 10^8$ по Аппельману, в титре $10^8 \cdot 10^7$ в отношении бактерий стрептококка. Активность компонентов бактериофагов кишечной и синальной палочек, протей также находилась в пределах $10^6 \cdot 10^6$ по Аппельману (табл. 2). В отличие от прототипа препарат очищенного лиобактериофага обладал антибактериальной активностью в отношении бактерий клебсиелл пневмонии в титре $10^5 \cdot 10^7$

Таким образом, использование предлагаемого способа получения препарата лиобактериофага позволяет расширить на $75 \pm 2\%$ спектр антибактериальной активности в отношении бактерий клебсиелл пневмонии, а также позволяет повысить качество за счет снижения токсических свойств препарата при полостном внутрибрюшинном введении за счет удаления в процессе очистки $98 \pm 1,1\%$ из

RU 2036232 C1

RU 2036232 C1

состава препарата метаболитов
бактериальных клеток и белков
культуральной среды.

Кроме того, использование предлагаемого
способа позволяет повысить выход на 50-90%
биомассы бактериофагов при их
культивировании, сократить время
культивирования в среднем на 21 ч, повысить
производительность и сократить время
технологического цикла фильтрации в
среднем на 25 ч и вести крупномасштабное
производство.

Внедрение препарата очищенного
пиобактериофага позволит дать
практическому здравоохранению
эффективный антибактериальный препарат,
превосходящий по своей активности как
антибиотики широкого спектра действия, так и
антибиотики резерва, отличительным
признаком которого в отличие от
антибиотиков является отсутствие

токсичности.

Формула изобретения:

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ

ПИБАКТЕРИОФАГА, включающий
культивирование бактерий и бактериофагов
стафилококка, стрептококка, синегнойной
палочки, кишечной палочки и протей в жидкой
питательной среде с последующим
сведением в один объем и стерилизующей
микрофильтрацией, отличающийся тем, что
дополнительно проводят культивирование
бактерий и бактериофагов клебсиелл, для
получения фаголизатов используют
бактерии-продуценты в экспоненциальной
фазе роста, микрофильтрацию проводят
через мембраны с размером пор 0,2 мкм,
после чего проводят ультрафильтрацию
через мембраны с порогом задержания
вещества 150 - 200 КД в режиме
тангенциального потока.

RU 2036232 C1

RU 2036232 C1

Таблица 1

Эффективность технологических этапов производства пиобактериофага в зависимости от способа получения

Оцениваемые признаки по технологическим этапам	Результат		
	Прототип	Предлагаемый способ	Значимость различия
I. Выход биомассы фагов при культивировании протейного синегнойной палочки кишечной палочки стрептококка стафилококка клебсиелл пневмонии	$(8,3 \pm 3,3) \cdot 10^8$ $(1,1 \pm 0,24) \cdot 10^9$ $(2,6 \pm 0,45) \cdot 10^8$ $(3,3 \pm 1,14) \cdot 10^6$ $(6,86 \pm 2,8) \cdot 10^7$ Нет	$(5,98 \pm 2,8) \cdot 10^9$ $(1,1 \pm 0,49) \cdot 10^{10}$ $(8,2 \pm 1,8) \cdot 10^8$ $(3,0 \pm 0,29) \cdot 10^7$ $(3,3 \pm 0,86) \cdot 10^8$ $(8,2 \pm 2,9) \cdot 10^8$	P<0,001 P<0,05 P<0,05 P<0,05 P<0,05 Нет
II. Длительность процесса культивирования	24 ± 1 ч	3 ± 1 ч 4 м ²	P<0,001
III. Микрофилтрация (100л)	-	фильтры 0,2 мкм 10-мин	-

Продолжение табл. 1

Оцениваемые признаки по технологическим этапам	Результат		
	Прототип	Предлагаемый способ	Значимость различия
IV. Очистка препарата от балластных веществ (метаболиты бактерий, белки) 100 л – ультрафилтрация	-	8 м ² (15 мин) удаление 98 ± 1,1% балластных веществ	-
V. Заключительная стерилизующая микрофилтрация (100 л)	100 свечей 7-8 ч	5 м ² фильтры 0,2 мкм 0,5-1 ч	-
VI. Длительность технологического цикла	32 ± 2 ч	5 ± 1 ч	P<0,001

Таблица 2

Биологические свойства препарата пиобактериофага

Оцениваемые свойства препарата (сравниваемые признаки)	Результаты	
	Прототип	Предлагаемый способ получения
Специфическая антибактериальная активность в отношении бактерий клебсиелл пневмонии спектр действия (% лизирующихся штаммов) активность по Апфельману Степень очистки препарата (по белку) Токсичность при внутрибрюшинном введении хроническая острая	Нет Нет Нет Патологические изменения в легких, печени и почек —	$75 \pm 2\%$ 10^5-10^7 $98 \pm 1,1\%$ Патологических изменений нет —